ว.วิทย. มข. 41(4) 823-832 (2556) KKU Sci. J. 41(4) 823-832 (2013)

การเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบสมชีพ

Symbiotic Seed Germination of Orchids

สุรีย์พร นนทชัยภูมิ[1]

บทคัดย่อ

กล้วยไม้เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และกล้วยไม้ไทยส่วนใหญ่ยังเป็นพืชหายากหรือถูกคุกคามใกล้สูญพันธุ์ การเพาะเมล็ดเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการขยายพันธุ์กล้วยไม้ลูกผสมเพื่อคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ และการขยายพันธุ์กล้วยไม้ชนิดที่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่ประสบความสำเร็จ การเพาะเมล็ดแบบสมชีพหรือการเพาะเมล็ดโดยการเลี้ยงร่วมกับราไมคอร์ไรซากล้วยไม้เป็นทางเลือกหนึ่งของการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ การศึกษาเชิงเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบใช้อาหารสังเคราะห์และแบบสมชีพในหลอดทดลองพบว่า การเพาะเมล็ดแบบสมชีพให้ผลดีกว่า เนื่องจากเมล็ดที่มีราไมคอร์ไรซาสามารถดูดซับน้ำได้ดีกว่า และโพรโทคอร์มที่เจริญจากการเพาะเมล็ดแบบสมชีพสามารถพัฒนาได้รวดเร็วกว่า บทความนี้มุ่งเน้นที่จะนำเสนอความรู้ปัจจุบันที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบสมชีพ ได้แก่ สรีรวิทยาของเมล็ดกล้วยไม้ ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ วิธีเพาะเมล็ดแบบสมชีพ และปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบสมชีพ ความเข้าใจเกี่ยวกับความต้องการของการเพาะเมล็ดแบบสมชีพจะช่วยพัฒนาให้เทคนิคนี้สามารถใช้สำหรับการขยายพันธุ์กล้วยไม้เพื่อการค้าและการอนุรักษ์

[1]สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง อ.เมือง จ.เชียงราย 57100

E-mail: nontachaiyapoom@yahoo.com, s.nontachaiyapoom@sci.mfu.ac.th

ABSTRACT

Orchids are economically important plants. Moreover, majority of native Thai orchids are rare or endangered. Seed germination is a standard technique for propagation of orchid hybrids to select desirable traits and for propagation of orchid species recalcitrant to tissue culture. Symbiotic seed germination, i.e., germination of seeds by co-culturing with orchid mycorrhizal fungus, is an option of orchid seed germination. Comparative studies between *in vitro* asymbiotic and symbiotic seed germination demonstrated that symbiotic method gave superior results compared to asymbiotic method because mycorrhizal fungus-infected seeds absorbed water better than non-infected seeds. Moreover, protocorms from symbiotic method could develop more rapidly than protocorms from asymbiotic method. This article is aimed to review current knowledge concerning symbiotic orchid seed germination including physiology of orchid seeds, orchid mycorrhizal fungi, symbiotic germination methods, and factors influencing symbiotic orchid seed germination. Understanding the requirements for symbiotic seed germination will assist the improvement of this technique to be used for commercial orchid propagation and conservation.

คำสำคัญ: กล้วยไม้ การงอกแบบสมชีพ ไมคอร์ไรซากล้วยไม้

Keywords: Orchid, Orchid mycorrhiza, Symbiotic seed germination

บทนำ

กล้วยไม้ ได้แก่ พืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่อยู่ในวงศ์กล้วยไม้ (Orchidaceae) เป็นพืชกลุ่มที่มีความหลากหลายทางชนิดมากที่สุดกลุ่มหนึ่ง กล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย และกล้วยไม้ท้องถิ่นส่วนใหญ่ยังเป็นพืชหายากหรือถูกคุกคามใกล้สูญพันธุ์ (Nanakorn and Indharamusika, 1998) แม้ว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะเป็นเทคนิคที่ใช้ขยายพันธุ์กล้วยไม้เชิงพาณิชย์อย่างแพร่หลาย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้หลายชนิดยังไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากปัญหาเช่น ต้นกล้วยไม้ในขวดไม่เจริญเติบโตและพัฒนา ปล่อยสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ที่เป็นพิษ หรือมีลักษณะผิดปกติ และ/หรือมีอัตราการตายหลังการย้ายออกปลูกสูง (Chugh et al., 2009) ทางเลือกหนึ่งของการขยายพันธุ์กล้วยไม้ คือการเพาะเมล็ด วิธีนี้นอกจากสามารถใช้ขยายพันธุ์กล้วยไม้ที่ไม่สามารถใช้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แล้ว ยังเป็นวิธีที่ใช้ขยายพันธุ์กล้วยไม้ลูกผสมเพื่อคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ และเป็นวิธีที่ดีที่สุดสำหรับการขยายพันธุ์กล้วยไม้เพื่อการอนุรักษ์ เนื่องจากทำให้ได้ต้นที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง การเพาะเมล็ดกล้วยไม้อาจทำได้โดยการใช้อาหารสังเคราะห์ (asymbiotic seed germination) หรือโดยการเลี้ยงร่วมกับราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ (orchid mycorrhizal fungi) ซึ่งเรียกว่า การเพาะเมล็ดแบบสมชีพ (symbiotic seed germination) (Yam and

Arditti, 2009) แม้ว่าในปัจจุบันการเพาะเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์ยังเป็นที่นิยมมากกว่า แต่สำหรับกล้วยไม้หลายชนิด การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเมล็ดโดยใช้อาหารสังเคราะห์ และการเพาะเมล็ดแบบสมชีพ พบว่า การเพาะเมล็ดแบบสมชีพให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงกว่า และโพรโทคอร์ม (protocorm) จากการงอกของเมล็ดสามารถพัฒนาได้รวดเร็วกว่า (Rasmussen et al., 1990; Johnson et al., 2007; Nontachaiyapoom et al., 2011) ต้นกล้วยไม้ที่มีราไมคอร์ไรซายังสามารถช่วยปลูกเชื้อราที่มีประโยชน์ให้กับดิน (Stewart and Zettler, 2002; Johnson et al., 2007) นอกจากนี้วิธีเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบสมชีพบางวิธีไม่จำเป็นต้องพึ่งพาห้องปฏิบัติการและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ราคาแพง จึงน่าจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้โดยทั่วไป บทความนี้มุ่งเน้นที่จะนำเสนอองค์ความรู้ทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบสมชีพ

สรีรวิทยาและการงอกของเมล็ดกล้วยไม้

กล้วยไม้มีเมล็ดขนาดเล็ก กว้าง 0.01-0.9 มิลลิเมตร ยาว 0.05-6 มิลลิเมตร และมีน้ำหนักเพียง 0.31-24 ไมโครกรัม ฝักกล้วยไม้หนึ่งฝักอาจมีเมล็ดเพียง 20 เมล็ดจนถึง 4 ล้านเมล็ด เมล็ดกล้วยไม้ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเมล็ด (testa) ซึ่งมักมีลักษณะโปร่งใส และเอ็มบริโอ (embryo) ซึ่งมีขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับปริมาตรทั้งหมดของเมล็ด เมล็ดกล้วยไม้จึงมีลักษณะคล้ายถุงอากาศ สามารถปลิวไปตามลมและลอยอยู่ในน้ำเป็นเวลานาน ช่วยในการกระจายพันธุ์ ด้วยขนาดและคุณสมบัติเช่นนี้ จึงเรียกเมล็ดกล้วยไม้ว่าเมล็ดฝุ่น (dust seed) เมล็ดกล้วยไม้ส่วนใหญ่ไม่มีเอนโดสเปิร์ม (endosperm) และเอ็มบริโอมักไม่มีใบเลี้ยง (Arditti and Ghani, 2000) จึงมีอาหารสะสมน้อย ส่วนมากอยู่ในรูปโปรตีนหรือลิพิด การสะสมอาหารพวกแป้งพบในกล้วยไม้บางชนิดเท่านั้น เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้ส่วนใหญ่มีอาหารสะสมน้อยหรือเอ็มบริโอไม่สามารถสลายอาหารให้เป็นพลังงานได้รวดเร็วเพียงพอสำหรับการงอก (Rasmussen, 1995) การเพาะเมล็ดกล้วยไม้บนอาหารสังเคราะห์ จึงต้องมีการเติมน้ำตาลให้เป็นอาหารของเอ็มบริโอ (Knudson, 1922) ในธรรมชาติ การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ต้องพึ่งพาสารอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งคาร์โบไฮเดรตจากราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ กระบวนการนี้เรียกว่า การงอกของเมล็ดแบบสมชีพ ค้นพบโดยนักพฤกษศาสตร์ชาวฝรั่งเศสชื่อ Noël Bernard เมื่อปี ค.ศ. 1899 (Yam and Arditti, 2009)

ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้กับการงอกของเมล็ดแบบสมชีพ

ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้มีลักษณะพิเศษคือการสร้างขดเส้นใย (peloton) ภายในเซลล์ของโพรโทคอร์ม หรือภายในเซลล์ชั้นคอร์เท็กซ์ (cortex) ของรากกล้วยไม้ ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ส่วนใหญ่เป็นราในกลุ่ม Basidiomycetes อยู่ในวงศ์ Ceratobasidaceae, Tulasnellaceae และ Sebacinaceae หรือ anamorph ของราในกลุ่มนี้ (Rasmussen, 2002; Dearnaley, 2007; Smith and Read, 2008) ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้หลายชนิดมีลักษณะที่คล้ายกับ *Rhizoctonia solani* Kühn คือ มีการแตกแขนงของเส้นใยเป็นมุมฉาก มีรอยคอดและผนังกั้น (septum) ใกล้จุดกำเนิด มักมีการสร้างเซลล์สั้น ๆ กลม ๆ เรียกว่า monilioid cells และไม่พบ clamp connection จึงถูกรวมเข้าอยู่ในสกุลจัดตั้ง (form-genus) *Rhizoctonia* หรือราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* (*Rhizotonia*-like fungi) (Sneh et al., 1991) อย่างไรก็ตาม พบราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ที่มี clamp connection ในราก

ของ *Cephalanthera austiniae* (A. Gray) A. Heller ซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่ไม่สร้างคลอโรฟิลล์ (Smith and Read, 2008) และพบ *Tuber* spp. ซึ่งเป็นราในกลุ่ม Ascomycetes สร้างขดเส้นใยในรากของกล้วยไม้สกุล *Epipactis* (Dearnaley, 2007) การจัดจำแนกราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ทำได้โดย (1) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น โคโลนี เส้นใย moniliod cells สปอร์ที่ได้จากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ และ anastomosis group (Sneh et al., 1991) วิธีนี้เริ่มต้นโดยการเลี้ยงราจากขดเส้นใยเดี่ยว (single peloton) หรือแยกราออกมาจากรากหรือโพรโทคอร์มที่มีขดเส้นใยเพื่อให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์ (pure culture) (2) การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacer และ 5.8S ribosomal DNA เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วจึงเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของราที่สนใจกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ในฐานข้อมูลสาธารณะ (White et al., 1990; Taylor and McCormick, 2008) วิธีนี้อาจใช้ตัวอย่างที่เป็นเชื้อราบริสุทธิ์ หรือใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่เฉพาะเจาะจงกับราเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรงจากเนื้อเยื่อกล้วยไม้ที่มีราไมคอร์ไรซา หรือ (3) ใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน ในต่างประเทศ มีการวิจัยทางด้านความหลากหลายทางชนิดของราไมคอร์ไรซากล้วยไม้อย่างกว้างขวาง ข้อมูลดังกล่าวมีการรวบรวมไว้ในบทความวิชาการและหนังสือ เช่น บทความของ Rasmussen (2002) และหนังสือของ Smith and Read (2008) สำหรับในประเทศไทย งานวิจัยทางด้านนี้ยังมีจำนวนค่อนข้างจำกัด การศึกษาในระยะแรกใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวในการจำแนกชนิดของรา (Athipunyakom et al., 2004a; 2004b) ปัจจุบันการศึกษาใช้ทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุล (Nontachaiyapoom et al., 2010; Chutima et al., 2011a) ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ที่พบมากที่สุด ได้แก่ *Epulorhiza* (anamorph ของราในสกุล *Tulasnella*) พบในกล้วยไม้ดิน (terrestrial orchid) และอิงอาศัย (epiphytic orchid) หลายสกุล เช่น สกุลสปาโทกลอตทิส (*Spathoglottis*) สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum*) สกุลกะเรกะร่อน (*Cymbidium*) สกุลหวาย (*Dendrobium*) และสกุลนางอั้ว (*Pecteilis*) (Athipunyakom et al., 2004a; 2004b; Nontachaiyapoom et al., 2010; Chutima et al., 2011a) รองลงมาคือ *Ceratorhiza* (anamorph ของราในสกุล *Ceratobasidium*) พบในกล้วยไม้ดินหลายชนิด (Athipunyakom et al., 2004b)

แม้ว่าราที่ไม่ใช่ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้บางชนิดสามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ (Umata, 1997; 1998; 1999; Vujanovic et al., 2000) โพรโทคอร์มที่ได้จากการเพาะเมล็ดเช่นนี้ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ ราไมคอร์ไรซาที่เข้ากันได้ (fully compatible) กับกล้วยไม้ ต้องเป็นราที่สามารถส่งเสริมการเจริญของโพรโทคอร์มจนเป็นต้นที่มีใบและรากสมบูรณ์ (Bonnardeaux et al., 2007) สำหรับกล้วยไม้ที่มีคลอโรฟิลล์ ใบที่สามารถสังเคราะห์แสงได้จะเป็นแหล่งอาหารหลักของต้นต่อไป ดังนั้นความเข้ากันได้ระหว่างราไมคอร์ไรซากล้วยไม้กับกล้วยไม้จึงเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อความสำเร็จของการเพาะเมล็ดแบบสมชีพ นอกจากนี้ กล้วยไม้ต่างชนิดแสดงความจำเพาะเจาะจง (specificity) กับชนิดของราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ขณะงอกแตกต่างกัน Warcup (1973) ศึกษาการงอกแบบสมชีพของกล้วยไม้ดินในประเทศออสเตรเลีย พบว่าการงอกแบบสมชีพของกล้วยไม้ในสกุล *Pterostylis* 2 ชนิด และในสกุล *Diuris* 2 ชนิด ต้องได้รับการกระตุ้นจากรา *Ceratobasidium cornigerum* (Bourdot) D. P. Rogers และ

Tulasnella calospora (Boud.) Juel [จำแนกใหม่เป็น *Tulasnella deliquescens* (Juel) Juel โดย Roberts (1994)] ตามลำดับ แต่การงอกของกล้วยไม้ในสกุล *Thelymitra* 7 ชนิด สามารถถูกกระตุ้นด้วยราในสกุล *Tulasnella* มากกว่า 1 ชนิด Stewart and Kane (2006) รายงานว่า เมล็ด *Habenaria macroceratitis* Willd. งอกได้ดีขึ้นเมื่อเลี้ยงร่วมกับราไมคอร์ไรซาที่ได้มาจากบริเวณเดียวกัน แต่ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้บางชนิดสามารถส่งเสริมการงอกและการพัฒนาของโพรโทคอร์มของกล้วยไม้หลายชนิด แม้ว่ากล้วยไม้เหล่านั้นจะไม่ใช่ชนิดเดียวกับที่ราถูกแยกออกมา ตัวอย่างเช่น *Epulorhiza* repens (Bernard) Moore (anamorph ของ *T. deliquescens*) ที่แยกออกมาจากรากของกล้วยไม้ดิน *Spiranthes brevilabris* Lindley สามารถกระตุ้นการงอกของกล้วยไม้หลายสกุล (Massey and Zettler, 2007) เมล็ดของว่านเพชรหึง (*Grammatophyllum speciosum* Blume) และเอื้องเงิน (*Dendrobium draconis* Rchb. f.) สามารถงอกและพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้โดยการกระตุ้นของรา *Epulorhiza* ที่ได้จากรากของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (Nontachaiyapoom et al., 2011) นอกจากนี้ ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ชนิดเดียวกันแต่ต่างไอโซเลต (isolate) ก็อาจมีความสามารถในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดแบบสมชีพแตกต่างกันมาก (Warcup, 1973; Stewart and Kane, 2006; Swangmaneecharern et al., 2011) *Epulorhiza* เป็นราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ที่พบมากที่สุด และมีรายงานว่าสามารถกระตุ้นการงอกแบบสมชีพของกล้วยไม้หลายสกุลหลายชนิด ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงของรานี้จึงมีศักยภาพที่จะพัฒนาไปใช้เพาะเมล็ดกล้วยไม้เชิงพาณิชย์หรือใช้ในโครงการอนุรักษ์กล้วยไม้ต่าง ๆ

วิธีเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบสมชีพ

การเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบสมชีพมี 4 วิธี ได้แก่ การเพาะเมล็ดในแหล่งธรรมชาติ (*in situ*) นอกแหล่งธรรมชาติ (*ex situ*) ในหลอดทดลอง (*in vitro*) และนอกหลอดทดลอง (*ex vitro*)

การเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบสมชีพในแหล่งธรรมชาติทำได้โดยการโรยเมล็ดไว้ในตาข่ายไนลอนที่มีความถี่น้อยกว่า 20 ไมโครเมตร เช่น ตาข่ายแพลงก์ตอน (plankton net) หรือผ้าฝ้ายโปร่ง (cotton gauze) พับตาข่ายใส่กรอบและฝังดินในบริเวณที่ต้องการจะศึกษา ส่วนมากเป็น ถิ่นอาศัยตามธรรมชาติของกล้วยไม้ชนิดนั้น ๆ (Rasmussen and Whigham, 1993; Masuhara and Katsuya, 1994) การเพาะเมล็ดแบบสมชีพนอกแหล่งธรรมชาติดัดแปลงวิธีมาจากการเพาะเมล็ดในแหล่งธรรมชาติ วิธีนี้แยกเอาอินทรีย์วัตถุและดินชั้นบนจากดินตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติซึ่งเป็นส่วนที่มีรามาใช้เพาะเมล็ด (Brundrett et al., 2003) วิธีเพาะเมล็ดในและนอกแหล่งธรรมชาติ มีอีกชื่อหนึ่งว่า วิธีใช้เมล็ดล่อ (seed baiting method) เหมาะสำหรับศึกษาความหลากหลายทางชนิดของราไมคอร์ไรซากล้วยไม้และความจำเพาะเจาะจงระหว่างรากับกล้วยไม้ตามธรรมชาติ (Masuhara and Katsuya, 1994; Batty et al., 2001; Diez, 2007; Bidartondo and Read, 2008) แต่ไม่สามารถใช้ขยายพันธุ์กล้วยไม้ในปริมาณมาก ๆ (Aewsakul et al., 2013) และไม่สามารถใช้เพาะเมล็ดกล้วยไม้ประเภทอิงอาศัย

การเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบสมชีพในหลอดทดลองพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1911 โดยนักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมันชื่อ Hans Edmund Nikola Burgeff (Yam and Arditti, 2009) เริ่มต้นโดยการแยกราไมคอร์ไรซาออกมาจากเนื้อเยื่อกล้วยไม้เพื่อให้ได้เชื้อรา

บริสุทธิ์ จากนั้นจึงเลี้ยงเมล็ดร่วมกับเชื้อราบนอาหารอินทรีย์อย่างง่าย เช่น oat meal agar วิธีนี้เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้สำหรับยืนยันว่า ราที่แยกได้จากรากหรือโพรโทคอร์มของกล้วยไม้สามารถพัฒนาไมคอร์ไรซากับกล้วยไม้ชนิดนั้น ๆ และใช้ศึกษาความจำเพาะเจาะจงและความเข้ากันได้ระหว่างรากับกล้วยไม้ (Athipunyakom et al., 2004a; Bonnardeaux et al., 2007; Otero et al., 2007; Chutima et al., 2011b) วิธีนี้ยังใช้เพาะเมล็ดกล้วยไม้ดินและกล้วยไม้อิงอาศัยที่เป็นกล้วยไม้เศรษฐกิจและกล้วยไม้ที่ถูกคุกคามจำนวนมาก (Masuhara and Katsuya, 1994; Zettler and McInnis, 1994; Massey and Zettler, 2007; Nontachaiyapoom et al., 2011; Swangmaneecharern et al., 2012)

การเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบสมชีพนอกหลอดทดลอง คล้ายวิธีเพาะเมล็ดแบบสมชีพในหลอดทดลองตรงที่ต้องมีเชื้อราไมคอร์ไรซากล้วยไม้บริสุทธิ์ แต่ต่างกันตรงที่วัสดุที่ใช้เพาะเมล็ดเป็นวัสดุธรรมชาติและขั้นตอนการเพาะเมล็ดไม่ต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ Quay et al. (1995) เพาะเมล็ดกล้วยไม้ดินของประเทศออสเตรเลียสองชนิดบนเพอร์ไลต์ (perlite) ผสมกับเศษใบไม้ของต้น *Allocasuarina fraseriana* (Miq.) L. Johnson ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยใช้รังสีแกมมาหรือการพาสเจอไรส์ และปลูกเชื้อราโดยการตัดวุ้นที่มีราเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปใส่ในดินโดยใช้หลอดฉีดยา อย่างไรก็ตามการเตรียมวัสดุสำหรับเพาะเมล็ดตามวิธีของ Quay et al. (1995) ค่อนข้างยุ่งยาก และไม่เป็นที่นิยม Aewsakul et al. (2013) รายงานวิธีเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบสมชีพนอกหลอดทดลองแบบง่าย โดยการปลูกเชื้อราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ในวัสดุเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ที่หาซื้อได้ทั่วไป ได้แก่ ดิน ขุยมะพร้าว หรือพีทมอส ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) แล้วจึงโรยเมล็ดลงบนวัสดุเหล่านี้โดยไม่ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ การเพาะเมล็ดว่านจุก (*Spathoglottis plicata* Blume) ด้วยวิธีนี้ให้เปอร์เซ็นต์การงอกค่อนข้างสูงและโพรโทคอร์มสามารถเจริญเติบโตและพัฒนาได้เป็นอย่างดี การเพาะเมล็ดแบบสมชีพนอกหลอดทดลองมีข้อได้เปรียบการเพาะเมล็ดในหลอดทดลองคือ (1) ขั้นตอนการเพาะเมล็ดไม่ต้องพึ่งพาห้องปฏิบัติการและเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ราคาแพง เช่น หม้อนึ่งความดันและตู้ปลอดเชื้อ ผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ทั่วไปสามารถทำได้ (2) ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด ทำให้ลดการสูญเสียเมล็ดระหว่างขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ และ (3) ไม่ต้องมีขั้นตอนการปรับสภาพต้นกล้วยไม้ก่อนนำออกปลูก ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการขยายพันธุ์กล้วยไม้เชิงพาณิชย์และเพื่อการอนุรักษ์

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบสมชีพ

การศึกษาเรื่องปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบสมชีพยังมีจำนวนน้อย และส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในกล้วยไม้ดินในเขตอบอุ่น ปัจจัยที่มีรายงานว่า มีผลต่อการเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบสมชีพนอกเหนือจากความจำเพาะเจาะจงและความเข้ากันได้ระหว่างกล้วยไม้และราไมคอร์ไรซา ได้แก่ คุณภาพของเมล็ด เยื่อหุ้มเมล็ด ความหนาแน่นของโพรโทคอร์ม อุณหภูมิและแสง

คุณภาพของเมล็ดมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาของโพรโทคอร์ม Zettler and Hofer (1998) รายงานว่า การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ดิน *Platanthera clavellata* (Michx.) Luer ซึ่งเก็บจากประชากรที่แตกต่างกัน 3 แหล่ง ให้เปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาของโพรโทคอร์มแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากกล้วยไม้ชนิดนี้เป็นกล้วยไม้ที่ผสมตัวเอง (auto-pollinated) ประชากรที่แตกต่างกันจึง

ให้คุณภาพของเมล็ดต่างกัน บางประชากรอาจให้เมล็ดที่มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง แต่โพรโทคอร์มไม่พัฒนา ในขณะที่บางประชากรให้เปอร์เซ็นต์การงอกต่ำ แต่โพรโทคอร์มพัฒนาได้ดีกว่า นอกจากนี้ยังมีบทความของ Massey and Zettler (2007) ที่สนับสนุนว่าแหล่งที่มาของเมล็ดกล้วยไม้มีผลต่อการงอกแบบสมชีพ

เยื่อหุ้มเมล็ดกล้วยไม้เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เมล็ดกล้วยไม้พักตัว เมื่อเมล็ดเติบโตเต็มที่ เยื่อหุ้มเมล็ดจะมีซูเบอริน (suberin) สะสมอยู่มาก ทำให้น้ำไม่สามารถซึมผ่านได้ แม้ว่าเมล็ดที่งอกแบบสมชีพจะมีราไมคอร์ไรซาแทงเส้นใยผ่านเยื่อหุ้มเมล็ดหรือเข้าสู่เมล็ดทางรูเปิดเล็ก ๆ ที่เรียกว่า ไมโครพายล์ (micropyle) ช่วยให้น้ำผ่านเข้าเมล็ดได้ดีขึ้น แต่การทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดบางลงโดยใช้สารเคมีจะช่วยให้เมล็ดงอกได้ดีขึ้นกว่าการใช้ราไมคอร์ไรซาเพียงอย่างเดียว สารเคมีที่นิยมใช้ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดอยู่แล้ว โดยใช้ที่ความเข้มข้น 5% เป็นเวลา 10-45 นาที หากเติมสารลดแรงตึงผิวจะได้ผลดีขึ้น ในบางกรณีการใช้สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรด์ ($Ca(OCl)_2$) เข้มข้น 5-7.5% ให้ผลดีกว่าโซเดียมไฮโปคลอไรด์ การเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของน้ำวิธีอื่น ๆ เช่น การใช้กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น 0.5-2% และการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Rasmussen, 1995)

ความหนาแน่นของโพรโทรคอร์มเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเมล็ดแบบสมชีพ Rasmussen et al. (1989) ศึกษาการเพาะเมล็ดแบบสมชีพของกล้วยไม้ *Dactylorhiza majalis* (Rchb.) P.F.Hunt & Summerh. พบว่า ความหนาแน่นหรือจำนวนสุทธิของโพรโทคอร์มในจานเลี้ยง มีผลต่อการอยู่รอดของโพรโทคอร์ม โดยโพรโทคอร์มที่เจริญช้ากว่าจะมีโอกาสตายสูงกว่าโพรโทคอร์มขนาดใหญ่

อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราโพรโทคอร์ม และการพัฒนาไมคอร์ไรซา จึงมีผลต่อการงอกแบบสมชีพ Rasmussen et al. (1990) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการงอกแบบสมชีพของกล้วยไม้ดินในเขตอบอุ่น *D. majalis* คือ 23-25.5 °C อุณหภูมิที่สูงกว่านี้จะทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกต่ำลง ขนาดของโพรโทคอร์มเล็กลง และมีอาหารสะสมน้อยลง และในบางโอกาสโพรโทคอร์มอาจตายเพราะถูกปกคลุมด้วยเส้นใยของเชื้อรา ในขณะที่อุณหภูมิที่ดีที่สุดสำหรับ *Dactylorhiza purpurella* (T.Stephenson & T.A.Stephenson) Soó คือ 23 และ 29°C อุณหภูมิที่สูงกว่านี้จะทำให้ภาวะสมชีพไม่เสถียร นอกจากนี้ เมล็ดกล้วยไม้บางชนิด เช่น *Platanthera leucophaea* (Nuttall) Lindley ต้องการอุณหภูมิต่ำ (6±2 °C) เพื่อทำลายระยะพักตัว (cold stratification) ก่อนการเพาะเมล็ดแบบสมชีพ (Zettler et al., 2001)

ช่วงแสงที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้แบบสมชีพขึ้นอยู่กับถิ่นอาศัยและชนิดของกล้วยไม้ Zettler and McInnis (1994) ทดสอบการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดินซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นของทวีปอเมริกาเหนือ *Platanthera integrilabia* (Correll) Luer ในสภาพแสง 4 แบบ คือ (1) บ่มในที่มืด 1 สัปดาห์แล้วตามด้วยการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน (2) ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน 1 สัปดาห์แล้วตามด้วยการบ่มในที่มืด (3) ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน อย่างต่อเนื่อง และ (4) บ่มในที่มืดอย่างต่อเนื่อง พบว่า เมล็ดสามารถงอกได้ดีที่สุดเมื่อให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน 1 สัปดาห์แล้วตามด้วยการบ่มในที่มืด อย่างไรก็ตาม Stewart and Kane (2006) ศึกษาการงอกแบบสมชีพของกล้วยไม้หายากในเขตกึ่งร้อน *H. macroceratitis* พบว่า ความมืดอย่างต่อเนื่องจะยับยั้งการงอกแต่จะส่งเสริมการพัฒนาของโพรโทคอร์ม การให้แสงอย่างต่อเนื่องหรือให้แสง 16

ชั่วโมง/วัน จะให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงกว่า แต่โพรโทคอร์มพัฒนาช้ากว่า

บทสรุป

การเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบสมชีพนอกจากจะใช้เป็นเครื่องมือสำหรับศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกล้วยไม้และราไมคอร์ไรซาแล้ว ยังเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการขยายพันธุ์กล้วยไม้ที่ไม่สามารถขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเพาะเมล็ดด้วยอาหารสังเคราะห์ ความสำเร็จของการเพาะเมล็ดแบบสมชีพขึ้นอยู่กับการเลือกวิธีที่เหมาะสม การใช้ราไมคอร์ไรซาที่เข้ากันได้กับกล้วยไม้และเป็นไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูง นอกจากนี้พันธุกรรมของกล้วยไม้เองและปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ ก็มีผลต่อการงอกแบบสมชีพ การศึกษาวิจัยด้านราไมคอร์ไรซากล้วยไม้และปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ในกล้วยไม้เขตร้อนอย่างต่อเนื่องจะช่วยให้การเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบสมชีพเป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับขยายพันธุ์กล้วยไม้เพื่อการค้าและการอนุรักษ์

เอกสารอ้างอิง

Aewsakul, N., Maneesorn, D., Serivichyaswat, P., Taluengjit, A. and Nontachaiyapoom, S. (2013). *Ex vitro* symbiotic seed germination of *Spathoglottis plicata* Blume on common orchid cultivation substrates. Scientia Horticulturae 160: 238-242.

Arditti, J. and Ghani, A.K.A. (2000). Transley review no. 110: Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. New Phytologist 145(3): 367-421.

Athipunyakom, P., Manoch, L., Piluek, C., Artijariyasripong, S. and Tragulrung, S. (2004a). Mycorrhizal fungi from *Spathoglottis plicata* and the use of these fungi to germinate seeds of *S. plicata* in vitro. Kasetsart Journal (Natural Science) 38(1): 83–93.

Athipunyakom, P., Manoch, L. and Piluek, C. (2004b). Isolation and identification of mycorrhizal fungi from eleven terrestrial orchids. Kasetsart Journal (Natural Science) 38(2): 216-228.

Batty, A.L., Dixon, K.W., Brundrett, M. and Sivasithamparam, K. (2001). Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a mediterranean bushland. New Phytologist 152(3): 511-520.

Bidartondo, M.I. and Read, D.J. (2008). Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. Molecular Ecology 17(16): 3707-3716.

Bonnardeaux, Y., Brundrett, M., Batty, A., Dixon, K., Koch, J. and Sivasithamparam, K. (2007). Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. Mycological Research 111(1): 51-61.

Brundrett, M.C., Scade, A., Batty, A.L., Dixon, K.W. and Sivasithamparam, K., (2003). Development of *in situ* and *ex situ* seed baiting techniques to detect mycorrhizal fungi from terrestrial orchid habitats. Mycological Research 107(10): 1210-1220.

Chugh, R., Guha, S., and Rao, I. U. (2009). Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. Scientia Horticulturae 122(4): 507-520.

Chutima, R., Dell, B., Vessabutr, S., Bussaban, B. and Lumyong, S. (2011a). Endophytic fungi from *Pecteilis susannae* (L.) Rafin (Orchidaceae), a

threatened terrestrial orchid in Thailand. Mycorrhiza 21(3): 221-229.

Chutima, R., Dell, B. Lumyong, S. (2011b). Effects of mycorrhizal fungi on symbiotic seed germination of *Pecteilis susannae* (L.) Rafin (Orchidaceae), a terrestrial orchid in Thailand. Symbiosis 53(3): 149-156.

Dearnaley, J.D.W. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. Mycorrhiza 17(6): 475-486.

Diez, J.M. (2007). Hierarchical patterns of symbiotic orchid germination linked to adult proximity and environmental gradients. Journal of Ecology 95(1): 159-170.

Johnson, T.R., Stewart, S.L., Dutra, D., Kane, M.E. and Richardson, L. (2007). Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae) – preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. Plant Cell Tissue and Organ Culture 90(3): 313–323.

Knudson, L. (1922). Non-symbiotic germination of orchid seeds. Botanical Gazette 73(1): 1-25.

Massey, E.E. and Zettler, L.W. (2007). An expanded role for *in vitro* symbiotic seed germination as a conservation tool: Two case studies in North America (*Plantanthera leucophaea* and *Epidendrum nocturnum*). Lankesteriana 7(1-2): 303-308.

Masuhara, G. and Katsuya, K. (1994). *In situ* and *in vitro* specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). New Phytologist 127(4): 711-718.

Nanakorn, W., and Indharamusika, S. (1998). *Ex-situ* conservation of native Thai orchids at Queen Sirikit Botanic Garden. Pure and Applied Chemistry 70(11): 2065-1245.

Nontachaiyapoom, S., Sasirat, S. and Manoch, L. (2010). Isolation and identification of *Rhizoctonia*-like fungi from roots of three orchid genera, *Paphiopedilum*, *Dendrobium* and *Cymbidium* collected in Chiang Rai and Chiang Mai provinces of Thailand. Mycorrhiza 20(7): 459-471.

Nontachaiyapoom, S., Sasirat, S. and Manoch, L. (2011). Symbiotic seed germination of *Grammatophyllum speciosum* Blume and *Dendrobium draconis* Rchb. f., native orchids of Thailand. Scientia Horticulturae 130(1): 303-308.

Otero, J.T., Flanagan, N.S., Herre, E.A., Ackerman, J.D. and Bayman, P. (2007). Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidacea). American Journal of Botany 94(12): 1944-1950.

Quay, L., McComb, J.A. and Dixon, K.W. (1995). Methods for *ex vitro* germination of Australian Terrestrial Orchids. HortScience 30(7): 1445-1446.

Rasmussen, H.N. (1995). Terrestrial Orchids. Cambridge: Cambridge University Press.

Rasmussen, H.N. (2002). Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. Plant and Soil 244(1-2): 149-163.

Rasmussen, H., Andersen, T. F., and Johansen, B. (1990). Temperature sensitivity of *in vitro* germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus. Plant Cell and Environment 13(2): 171-177.

Rasmussen, H., Johansen, B. and Andersen, T.F. (1989). Density-dependent interactions between seedlings of *Dactylorhiza majalis*

(Orchidaceae) in symbiotic *in vitro* culture. Physiologia Plantarum 77(4): 473-478.

Rasmussen, H.N. and Whigham, D.F. (1993). Seed ecology of dust seeds *in situ*: a new study technique and its application in terrestrial orchids. American Journal of Botany 80(12): 1374-1378.

Roberts, P. (1994). Long-spored *Tulasnella* species from Devon, with additional notes on allantoid-spored species. Mycological Research 98(11): 1235-1244.

Smith, S.E. and Read, D.J. (2008). Mycorrhizal Symbiosis. New York: Academic Press pp. 419-506.

Sneh, B., Burpee, L. and Ogoshi, A. (1991). Identification of *Rhizoctonia* species. St. Paul, Minnesota: APS Press p. 2.

Stewart, S.L. and Kane, M.E. (2006). Symbiotic seed germination of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. Plant Cell Tissue and Organ Culture 86(2): 159-167.

Stewart, S.L. and Zettler, L.W. (2002). Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. Aquatic Botany 72(1): 25-35.

Swangmaneecharern, P., Serivichyaswat, P. and Nontachaiyapoom, S. (2012). Promoting effect of orchid mycorrhizal fungi *Epulorhiza* isolates on seed germination of *Dendrobium* orchids. Scientia Horticulturae 148: 55-58.

Taylor, D.L. and McCormick, M.K. (2008). Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. New Phytologist 177(4): 1020-1033.

Umata, H. (1997). *In vitro* germination of *Erythrorchis ochobiensis* (Orchidaceae) in the presence of *Lyophyllum shimeji*, an ectomycorrhizal fungus. Mycoscience 38(3): 355–357.

Umata, H. (1998). A new biological function of shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, in a myco-heterotrophic orchid, *Erythrorchis ochobiensis*. Mycoscience 39(1): 85–88.

Umata, H. (1999). Germination and growth of *Erythrorchis ochobiensis* (Orchidaceae) accelerated by monokaryons and dikaryons of *Lenzites betulinus* and *Trametes hirsuta*. Mycoscience 40(4): 367–371.

Vujanovic, V., St-Arnaud, M., Barabé, D. and Thibeault, G. (2000). Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. Annals of Botany 86(1): 79-86.

Warcup, J.H. (1973). Symbiotic germination of some Australian terrestrial orchids. New Phytologist 72(2): 387-392.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press. pp. 315-322.

Yam, T.W. and Arditti, J., (2009). History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. Plant Biotechnology Reports 3(1): 1-56.

Zettler, L.W. and McInnis, T.M. Jr. (1994). Light enhancement of symbiotic seed germination and development of an endangered terrestrial orchid (*Platanthera integrilabia*). Plant Science 102(2): 133-138.

❑❑❑❑❑